

1950

Anton Maier



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554410_0076

AUS DEM HYGIENISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MAINZ

Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe

UNTERSUCHUNGEN ZUR FRAGE DER RESISTENZSTEIGERUNG
VON STAPHYLOCOCCUS AUREUS GEGEN PENICILLIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

ANTON MAIER

aus

WIESBADEN-BIEBRICH

MAINZ

1958



Dekan: Prof. Dr. U. Köttgen
Referent: Doz. Dr. Dr. G. Gillissen
Korreferent: Prof. Dr. H. Kliewe

Datum des Diploms 24. JULI 1958

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
A. Einleitung	1
B. Literarische Übersicht über die Vorstellungen der Resistenzentstehung	2
C. Eigene Versuche	9
1. Versuche zur Resistenzänderung	9
a) Versuchsanordnung	9
b) Ergebnis	11
2. Vergleichende Bestimmung der Ribonucleinsäure und der Desoxyribonucleinsäure	12
a) Methode	12
D. Zusammenfassung	20
Literaturverzeichnis	21

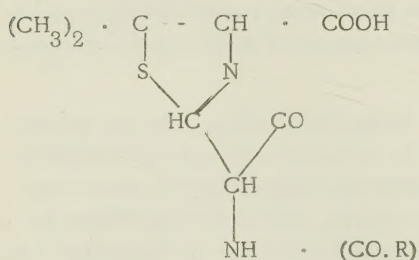
A. EINLEITUNG

Mit der breiten klinischen Anwendung von Penicillin entstanden neue Probleme. Bakterienstämme, die vorher sehr gut auf Penicillin ansprachen, entwickelten mit der Zeit gegen dieses Antibiotikum eine Resistenz. Diese resistent gewordenen Keime stellen eine große Gefahr dar, weil die entsprechenden Infektionen therapeutisch schwer zu beherrschen sind. Daraus ergibt sich das Interesse an der Erforschung der Resistenzentstehung. Unveröffentlichte Versuche (GILLISSEN) ergaben im hiesigen Institut, daß der sensible Teststamm *Staphylococcus aureus* Sg 511 eine signifikante Resistenzsteigerung erfährt, wenn er in einem Kulturfiltrat eines resistenten *Staphylococcus aureus*-Stammes gezüchtet wird.

In den vorliegenden Untersuchungen soll festgestellt werden, ob eine solche Resistenzsteigerung auch nach Züchtung des sensiblen Stammes im Kulturfiltrat eines resistenten Stammes eintritt, wenn das Medium des letzteren arm an Nährstoffen ist. Ferner soll untersucht werden, worauf die angeführte Resistenzsteigerung zurückzuführen ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse von HOTCHKISS, BELJANSKI u. a. (2; 5; 10; 13), wonach Nucleinsäuren bei der Resistenzentstehung eine wesentliche Rolle spielen sollen.

B. LITERARISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE VORSTELLUNGEN DER RESISTENZENTSTEHUNG

Der Londoner Bakteriologe ALEXANDER FLEMING entdeckte 1929, daß Schimmelpilze eine das Wachstum von Bakterien hemmende Substanz ausscheiden. Diese Versuche wurden 1940 von CHAIN, FLOREY u. a. in Oxford fortgeführt. Sie fanden, daß der Wirkstoff des Schimmelpilzes, das Penicillin (Pc.), eine starke Wirkung auf viele, besonders grampositive Erreger ausübt, für den Menschen aber kaum toxisch ist. Die chemische Struktur der Penicilline ist 1945 geklärt worden. Es handelt sich um Peptide mit einem 4-gliedrigen Beta-Lactam-Ring.



Durch Seitenketten (R) unterscheiden sich die verschiedenen Penicilline.

Eine klinische Anwendung finden ihre Natrium-, Kalium- und Calciumsalze.

Penicillinsensible Erreger sind vor allem Strepto-, Staphylo-, Pneumo-, Meningo- und Gonokokken.

In kleinen Dosen wirkt Pc. auf diese Erreger bakteriostatisch. Es greift die Bakterien in der Teilungsphase an. In größeren Konzentrationen hat es jedoch eine bakterizide Wirkung.

Man beobachtete aber bald, daß einige Bakterienarten im Laufe der Behandlung mit Pc. resistent wurden. In solchen Fällen mußte man - eine nicht zu hohe Keimresistenz vorausgesetzt - höhere Penicillindosen geben oder andere Antibiotika mit einem anderen Wirkungsmechanismus verwenden.

HOBBY u. Mitarb. (12) berichteten zunächst, daß Pc. Bakterienzellen angreift, ohne in sie einzudringen. In diesen Untersuchungen waren die Bakterienkonzentrationen allerdings so gering, daß eine Penicillinaufnahme von mehreren Tausend Molekülen pro Zelle schwer zu entdecken war.

PASYSKII und KASTORSKAYA fanden 1947 (18) jedoch bei einer hohen Keimkonzentration in einer Staph. aureus-Kultur, daß bis zu 1000 Penicillinmoleküle pro Zelle aufgenommen wurden. Neuere Untersuchungen (18; 17; 16) wurden mit ^{35}S markiertem Pc. durchgeführt. Dabei fand man 2 z. T. sich überlagernde Aufnahmemöglichkeiten von Pc. :

1. Eine von der Außenkonzentration unabhängige, einem konstanten Sättigungswert zustrebende spezifische Aufnahme von Pc., welche die Außenkonzentration weit übersteigen und in wenig konzentrierten Penicillinlösungen das gesamte Penicillin binden konnte.
2. Eine unspezifische Pc. -Diffusion in die Zelle hinein, die proportional zur Außenkonzentration anstieg. 750 - 3000 Pc. -Moleküle sollen pro Zelle spezifisch gebunden werden. Bei der spezifischen Fixierung handelt es sich wahrscheinlich um die Absättigung einer in den Zellen in beschränkter Menge vorhandenen Pc. bindenden Komponente, die COOPER (4) P. B. C. (Penicillin-binding-component) nennt. Diese P. B. C. besitzt eine sehr hohe Bindungsspezifität, denn die spezifische Bindung des Pc. ist irreversibel, d.h. sie läßt sich weder durch intensives Waschen noch durch Austausch gegen freies Pc. wieder aufheben. Zellen, die radioaktives Penicillin spezifisch gebunden haben, geben in konzentrierten gewöhnlichen Pc. -Lösungen keine Radioaktivität ins Medium ab. Ebenso nehmen Zellen, deren P. B. C. mit gewöhnlichem Pc. abgesättigt ist, in konzentrierten radioaktiv markierten Pc. -Lösungen keine Radioaktivität auf. L. ETTLINGER (8) berichtet, daß penicillinbehandelte Zellen beim weiteren Wachstum in pc-freiem Medium kein Pc. ausscheiden, sondern es während vieler Generationen an ihre Tochterzellen weitergeben, bis man es durch die Verdünnung nicht mehr nachweisen kann. Nach COOPER (4) scheint der Sitz der P. B. C. in der osmotischen Barriere der Zelle zu suchen sein. ETTLINGER (8) nimmt nach den neuesten Untersuchungen an, daß die P. B. C. bei Staphylokokken in der direkt unter der Zellwand sich befindenden, zum größten Teil aus Phospholipoiden bestehenden Schicht liegt. Daß nur das irreversibel spezifisch gebundene Pc. eine antibiotische Wirkung ausübt, wird durch Versuche von ETTLINGER (8) erhärtet. Eine spezifische Bindung bis zu einem Sättigungswert und irreversible Fixierung findet nur mit antibiotisch aktivem Penicillin statt. Inaktive Derivate wie Penicillinsäure, Penicillamin und Cysteinpenicillin können zwar in die Zelle eindringen, werden aber nur unspezifisch gebunden. Da die spezifisch gebundenen Penicillinbeträge sehr gering sind, und eben nur dieses irreversibel gebundene Penicillin antibiotisch wirksam ist, scheint die P. B. C. Bestandteil eines Coenzym zu sein, das durch seine Pc. -Bindung inaktiviert wird. Im Gegensatz zur irreversiblen, spezifischen Bindung von Pc. ist die unspezifische Bindung reversibel, d.h. sie kann durch Waschen oder durch Austausch gegen freies Pc. rückgängig gemacht werden.

Eine andere Frage ist, ob die Bakterienzellen unbeschränkt durchlässig für Pc. sind. Dies ist nach Versuchen von COOPER (4) mit Staph. nicht anzunehmen.

Beschädigte Zellen binden mehr reversibles Pc. als intakte Zellen. Diese stärkere reversible Bindung von Pc. durch die geschädigten Zellen liegt anscheinend an den durch die Zerstörung frei werdenden Proteinen. Die Zelle wird auch eine Reserve an P. B. C. besitzen, die nun zusätzlich Pc. bindet. Da Hegezellen (8; 16) für Pc. undurchlässig sind, so ist dies ein ausreichender Grund für ihre Pc. -Resistenz. Warmblüterzellen lassen zwar das Pc. eindringen, vermögen es aber nicht spezifisch zu binden (8). Ob die Bakterienresistenz aber allein auf eine verminderte Durchlässigkeit der Zellmembran zurückzuführen ist, soll zunächst dahingestellt bleiben.

Die spezifische Bindungsaffinität verschiedener Bakterienarten scheint im allgemeinen mit ihrer Pc. -Sensibilität in Beziehung zu stehen. Durch ihre Bindung an das Pc. wird die P. B. C., die für die Zelle funktionswichtig ist, inaktiviert. Im Maße ihrer Bindung an Pc. wird die P. B. C. durch Inaktivierung dem funktionellen Zellgeschehen entzogen. Die Pc. -Sensibilität läuft also parallel ihrer spezifischen Bindungsaffinität. Unter normalen Bedingungen binden sensible Bakterienstämme regelmäßig mehr Pc. als resistente Stämme, und ebenso binden zellfreie Keimextrakte Pc. im Verhältnis zur Sensibilität der intakten Zellen (6). Weitere Versuche von EAGLE (7; 4) scheinen allerdings dieser Regel zu widersprechen. Während die Resistenz von normalerweise isolierten Keimen entweder auf die Unfähigkeit der Zelle, das Pc. zu binden, auf die Bildung von Penicillinase, auf die intrazelluläre Degradierung von Pc. oder auf die genetisch fixierte Anlage der P. B. C. empfindlichen Zellkomponente, mit Pc. nur langsam zu reagieren, zurückgeführt wird, sollen die Verhältnisse bei künstlich resistent gezüchteten Keimen anders sein. Diese resistenten Varianten binden weniger Pc. als die sensiblen Mutterzellen. Andere binden die gleichen Mengen und wieder andere mehr. War die Pc. -Sensibilität nach COOPER (4) abhängig von der spezifisch gebundenen Pc. -Menge, so setzt EAGLE (6; 7) die Resistenzsteigerung nicht mehr einer Abnahme der spezifischen Pc. -Bindung parallel. Die Ursachen dafür sind bis jetzt unbekannt. Vielleicht wird die P. B. C. durch andere, weniger funktionswichtige Zellelemente ersetzt oder durch Zellkomponenten, die bei ihrer Bindung an das Pc. nicht funktionell inaktiviert werden. ETTLINGER (8) glaubt, dieses Abweichen von der Norm damit erklären zu können, daß die oben angeführte Regel nur für Wildformen und nicht für künstlich resistent gemachte Mutanten gilt.

KLEIN und KIMMELMANN (14) sehen die Resistenzentstehung z. T. dadurch erklärt, daß eine Art Selektion stattfindet. Durch Mutationen sollen einige wenige Bakterien für das Antibiotikum resistent werden; alle anderen Bakte-

rien werden getötet. DEMEREC (5) nimmt an, daß diese Resistenzbildung durch eine Serie kleiner Mutationen entsteht und nicht durch einen einzigen großen Mutationssprung. Die Pc. -Resistenz einer Zelle kann demnach von verschiedenen genetischen Faktoren abhängig sein.

GOOD (11) glaubt, einen Zusammenhang zwischen Resistenzentstehung und dem pH-Wert der Zelle gefunden zu haben. Einerseits ist es der intrazelluläre pH-Wert und andererseits der chemische Charakter der Antibiotika, nämlich ob Anion oder Kation, die nach Ansicht dieses Autors die Resistenzursachen darstellen. Eine Änderung des intrazellulären pH-Wertes nach der positiven sauren Seite hin setzte die Permeabilität der Zellmembran für basische (Kationen) Antibiotika herauf und für saure (Anionen) herab. Eine Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes nach der negativen basischen Seite hin hatte die umgekehrte Reaktion zur Folge. Der intrazelluläre pH-Wert kann durch das Alter der Kultur und durch den pH-Wert des Nährmediums beeinflusst werden. In einem leicht sauren Nährmedium verschob sich der intrazelluläre pH-Wert nach der sauren Seite hin. Eine Verschiebung des pH-Wertes ebenfalls nach der positiven Seite wurde mit zunehmendem Alter der Kultur beobachtet. Auch eine spontane Änderung des pH-Wertes bei einigen Stämmen unter 30 E. Coli-Stämmen wurde festgestellt. Nach GOOD läßt sich demnach die Resistenzentstehung durch eine Herabsetzung der Permeabilität der Zellmembran für das betreffende Antibiotikum erklären. Dies kann in einer spontanen oder experimentellen Veränderung des intrazellulären pH-Wertes der Zelle, vielleicht auch im pH-Wert des Nährmediums seine Ursache haben.

Unabhängig voneinander stellte EAGLE und COOPER (7, 4) fest, daß einige resistente Bakterien in ihr umgebendes Medium bei Zugabe von Pc. ein Enzym, die Penicillinase, ausscheiden, welches Pc. zur inaktiven Penicillinsäure abbaut. Wenn die Bakterienzahl groß genug ist, kann das Pc. inaktiviert werden, bevor es in die Zelle eindringen kann. Diese Penicillinasebildung dauert selbst über mehrere Generationen fort, wenn man kein Pc. mehr dem Nährmedium zusetzt (19).

Andere Bakterien, die keine meßbaren Beträge an Penicillinase in das Medium freisetzen, können jedoch Pc. inaktivieren, wenn es in die Zelle eingedrungen ist. Dies zeigte EAGLE (6) mit E. coli, Shigella und Proteus morganii. Keiner dieser Stämme gab signifikante Beträge an Penicillinase an das Medium ab. Auch hier dürfte das in die Zelle eingedrungene Pc. durch Bindung an irgendwelche Zellkomponenten inaktiviert werden. Diese Bindung scheint im Gegensatz zur irreversiblen, spezifischen Bindung von Pc. an die P.B.C. wesentlich instabiler zu sein und läßt sich durch Waschen wieder teilweise rückgängig machen.

Es wurde schon wiederholt, auf den Einfluß des Nährmediums auf die Resistenzentstehung hingewiesen. Wurde *H. pertussis* in Bordet-Gengou-Medium gezogen - SMOLENS und VOGT (21) -, so enthielt der Keim bedeutend mehr Desoxyribonucleinsäure als Ribonucleinsäure. Derselbe Stamm in Cohen-Wheeler-Medium gezüchtet ergab einen starken Anstieg der Ribonucleinsäure. Diese beiden, gleichen Stämme, auf verschiedenen Nährmedien gezüchtet, zeigten einen signifikanten Unterschied in ihrer Resistenz gegen Streptomycin, obwohl sie nie mit diesem Antibiotikum vorher in Berührung gekommen waren. Nur eine kleine Anzahl Bakterien, in Bordet-Gengou-Medium gezogen, wurden gegen Streptomycin resistent. Dies dürfte ein typisches Beispiel für eine selektive Auswahl sein. Hingegen wurden alle, in Cohen-Wheeler-Medium gewachsenen Bakterien stark resistent gegen Streptomycin. Wurden den Bakterien im Bordet-Gengou-Medium ansteigende Streptomycindosen zugesetzt, zeigten sie ebenfalls eine hohe Resistenz gegen Streptomycin, und ihr Ribonucleinsäuregehalt war jetzt stark angestiegen. Ähnliche Resultate ließen sich mit *Micrococcus pyogenes* erzielen. Auch bei *H. pertussis*-Stämmen zeigte sich ein bedeutender Anstieg des Ribonucleinsäuregehaltes, wenn sie durch ansteigende Zugaben von Terramycin in das Nährmedium künstlich resistent gemacht wurden.

Eine weitere interessante Beobachtung hierzu kommt von HOTCHKISS (13). Setzt man Desoxyribonucleinsäure eines resistenten Pneumokokkenstammes einem sensiblen Pneumokokkenstamm zu, so wird ein Resistenzgrad erreicht, der zwischen dem des sensiblen und des resistenten Stammes liegt. Auch HOTCHKISS, BELJANSKI, GEORGE und PANDALAI (13, 2, 10) fanden, daß bei Bakterien Pc.-Resistenz eintrat, wenn man ihren Medien Nucleinsäuren hinzusetzte. Bei diesen Versuchen sprechen GEORGE und PANDALAI (10) von einem Zusatz an Nucleinsäuren schlechthin und HOTCHKISS (13) von einer Zugabe von Desoxyribonucleinsäure zum Medium. Diese Ergebnisse lassen auf einen engen Zusammenhang zwischen Resistenzanstieg und Nucleinsäuregehalt schließen. Bei diesen Untersuchungen war ein starker Anstieg des Ribonucleinsäuregehalts der Keime beobachtet worden. Diese stärkere Ribonucleinsäuresynthese scheint andererseits mit dem Nährmedium wieder gekoppelt zu sein.

Es ist nun angebracht, einmal näher auf die Änderungen im Stoffwechselgeschehen der Zelle durch die Resistenzsteigerung bei Zugaben von Pc. in das Medium einzugehen. Hier sind zunächst einmal die Beobachtungen von GALE (9) zu erwähnen. Bei verschiedenen Bakterienarten gehen Pc.-Sensibilität und Assimilationsaffinität für Glutaminsäure parallel. Hoch Pc.-resistent gezüchtete Staphylokokken können keine Glutaminsäure mehr akkumulieren. Sie sind Aminosäure autotroph geworden. Umgekehrt auf Aminosäureautotrophie gezüchtete Staphylokok-

ken werden Pc. -resistent, ohne je mit Pc. in Berührung gekommen zu sein.

Züchtet man *Staphylococcus aureus* in Phosphatpuffer mit Glucose und einem Gemisch der essentiellen Aminosäuren, so tritt ein starker Proteinanstieg und leichte Zunahme der Nucleinsäuresynthese ein. Setzt man dem Nährmedium noch Purine und Pyrimidine zu, so ist neben einer weiteren Verstärkung der Proteinproduktion eine stark geförderte Nucleinsäuresynthese zu beobachten. Fehlen eine oder mehrere essentielle Aminosäuren, dann tritt entsprechend der Wichtigkeit dieser Aminosäuren ein Rückgang in beiden Synthesen ein. Das Fehlen von einzelnen Purinen oder Pyrimidinen verursacht keine bedeutende Senkung der Nucleinsäuresynthese mit Ausnahme der Abwesenheit von Uracil und Xanthin. Dieser Ausfall würde einem völligen Fehlen von Purinen und Pyrimidinen gleichkommen. Staphylokokken scheinen demnach Uracil und Xanthin nicht synthetisieren zu können.

Für die sich immer wieder andeutenden Wechselbeziehungen zwischen Nucleinsäure- und Proteinsynthese haben CALDWELL und HINSHELWOOD (3) folgende Erklärung gefunden: Die Nucleinsäuren steuern katalytisch die Proteinsynthese, und umgekehrt übt ein Teil, wenn nicht alles Protein, eine ähnliche Funktion auf die Nucleinsäuresynthese aus.

GALE (9) stellt sich zwei sich gegenseitig steuernde Reaktionszyklen vor, die er mit Hilfe der "Matrizentheorie" (templates) erklärt. Nach dieser Theorie sammeln sich zur Proteinsynthese aktivierte Aminosäuren an vorbestimmten Stellen der Matrizen, die in diesem Falle aus Nucleinsäuren bestehen, an. Die passenden Aminosäuren gehen jetzt untereinander Peptidverbindungen ein, lösen sich aber als "Präproteine" von der Matrize ab und wandeln sich danach in eigentliches Protein um. Die Bildung von Nucleinsäuren stellt sich GALE in einem mit diesem Zyklus gekoppelten Kreisprozeß vor, wobei dann umgekehrt Präproteine als Matrizen der Nucleinsäuresynthese fungieren.

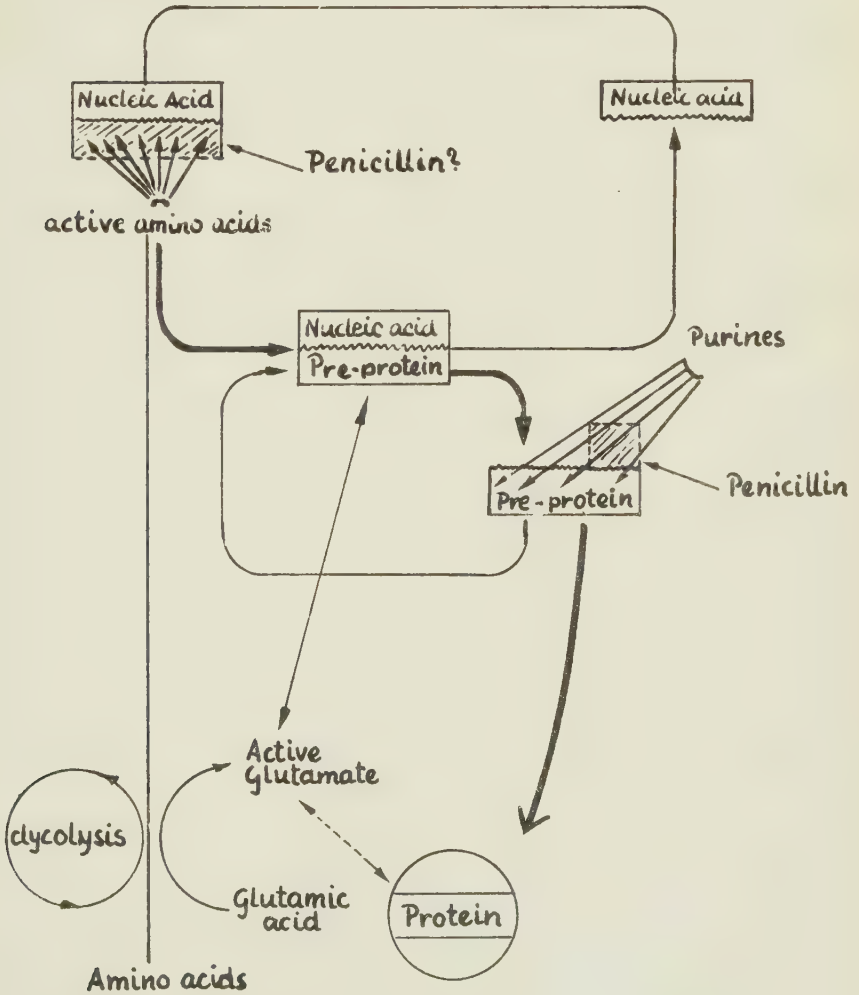
Nach den Vorstellungen von GALE setzt sich das Pc. bei größeren als bakteriostatischen Konzentrationen auf der Präproteinmatrize fest und versperrt den dort hingehörigen Purinen den Weg. Als zweite Angriffsstelle erscheint die Nucleinsäurematrize, wobei die Aminosäuren verdrängt werden. Pc. blockiert dadurch die Protein- und Nucleinsäuresynthese. Alle sich auf diesem blockierten Reaktionsprodukt aufbauenden Stoffe fallen aus, da es sich ja um eine Reaktionskette handelt. Da die vorausgehenden Reaktionen noch eine Zeitlang weiterlaufen, sammeln sich die Stoffe des in die blockierte Reaktion normalerweise eintretenden Zwischenproduktes an. Eine Gruppe solcher Stoffe hat man dann auch tatsächlich gefunden (9, 8). Wachsende Staphylokokken (8)

setzte man einer bakteriziden Pc. -Konzentration aus. Die Vermehrung durch Zellteilung hörte augenblicklich auf. Das eigentliche Zellwachstum ging aber eine Zeit (50') ungestört weiter, und es kam in der Zelle zu einer Anhäufung von freien Nucleotiden, die etwa 50% des Trockengewichtes der Zelle ausmachten. Diese Nucleotide hat man chemisch 1. als Uridin-5-pyrophosphat verbunden mit einem sauren N-Acetylaminozucker analysiert, ein weiteres zweites Nucleotid hat außerdem an dem Aminozyucker noch L-Alanin hängen, während Nucleotid 3) noch L-Lysin, D-Glutaminsäure und 3-L-Alaninmoleküle am Aminozyucker besitzt.

Bei diesen Nucleotiden dürfte es sich um die Zwischenprodukte der Nucleinsäuresynthese handeln.

Abb. 1: Vorstellung über die Nucleinsäure- und Proteinsynthese
sowie über die Angriffsmöglichkeiten des Penicillins

(nach GALE (9))



C. EIGENE VERSUCHE

1. Versuche zur Resistenzänderung

a) Versuchsanordnung

Nach noch nicht veröffentlichten Versuchen (GILLISSEN) wird der Pc. -sensible Staph. aureus Sg 511 in statistisch signifikanter Weise resistent, wenn dieser Stamm im Kulturfiltrat eines resistenten Staph. aureus-Stammes gezüchtet wird. Auf diese Ergebnisse soll unten in Verbindung mit eigenen Versuchen noch eingegangen werden.

Zunächst soll untersucht werden, ob eine solche Resistenzsteigerung auch dann möglich ist, wenn ein nährstoffarmes Medium in Form einer 1:10 mit phys. NaCl-Lösung verdünnten Fleischbouillon ohne Glucosezusatz sowohl für die Züchtung des resistenten Stammes zur Gewinnung des Kulturfiltrates als auch als Testmedium zur Austestung der ursprünglich sensiblen Keime, die in diesem Filtrat gewachsen sind, benutzt wird.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt generell in folgender Weise: Im Hinblick darauf, daß jeder Stamm bezüglich seiner Resistenz eine Mischpopulation darstellt, bei der die Verteilung der Resistenz auf die einzelnen Individuen dieser Population einer Normalverteilung entspricht, so daß sich nach der Austestung einer genügend großen Anzahl von Einzelindividuen die bekannte Gauß'sche Glockenkurve ergibt, werden von jedem Versuch 200 einzelne Kolonien der Bakterienpopulation ausgetestet und das arithmetische Mittel unter Berücksichtigung der Fehlerbreite (s. d. = standard deviation) mit dem anderer Versuche statistisch verglichen.

Versuch 1: Zur Kontrolle wird der Pc. -sensible Staph. aureus Sg. 511 in verdünnter Bouillon (s. o.) mit einem pH-Wert von pH 7,2 gezüchtet. 200 Keime aus dieser Kultur werden dann gegen Pc. ausgetestet.

Im einzelnen wird wie folgt vorgegangen:

Der Stamm Staph. aureus Sg 511 mit einer Pc. -Sensibilität von 0,04 E/ml wird aus der Kulturlösung fraktioniert auf Agar ausgestrichen. 200 isolierte Kolonien werden auf Schrägagar gezüchtet. Die so gewonnenen Einzelstämme werden nach erneuter Züchtung in Kulturlösung zur eigentlichen Beimpfung der Testlösung (1:100) benutzt. Von jedem Stamm wird eine Verdünnungsreihe in geometrischen Verdünnungsstufen mit einer Anfangskonzentration von 0,25 E Pc. /ml im ersten Röhrchen hergestellt.

Die erste Ablesung des Testergebnisses (Bakteriostase) erfolgt nach 24^h Bebrütung bei 37^o C nach der makroskopischen Beurteilung des eingetretenen Wachstums.

Nach 48^h Bebrütung wird von allen makroskopisch nicht gewachsenen Verdünnungsstufen und von der ersten makroskopisch bewachsenen Verdünnungsstufe eine Subkultur auf Agar angelegt (Baktericidie).

In beiden Fällen wird zur Berechnung der Resistenz die mittlere Pc. -Konzentration zwischen der letzten negativen und der ersten positiven Verdünnungsstufe herangezogen.

Alle Berechnungen erfolgen nach Student's-t-Test. (Ergebnis s. Tab. 1).

Versuch 2: Der Pc. -sensible Staph. aureus Sg 511 wird in dem Filtrat einer 24^h alten Kultur eines gegen 1000 E Pc. /ml resistenten Staph. aureus-Stammes gezüchtet. Im einzelnen wird dann weiterhin wie bei Versuch 1 vorgegangen. Zu vermerken ist lediglich, daß der Agar, auf dem der Staph. aureus Sg 511 isoliert wird, ebenfalls Kulturfiltrat (1:10) enthält. (Ergebnis s. Tab. 1).

Versuch 3: Der sensible Stamm wird genau wie in Versuch 2 behandelt, jedoch wird das Filtrat einer 48 Stunden alten Kultur desselben Pc. -resistenten Stammes verwendet. (Ergebnis s. Tab. 1).

Versuch 4: Der Versuchsansatz entspricht dem von Versuch 2, jedoch wird das Kulturfiltrat des resistenten Stammes vor Benutzung 20 Minuten bei 120^o C autoklaviert. (Ergebnis s. Tab. 1).

Tabelle 1: Versuche zur Resistenzänderung im nährstoffarmen Medium

Mittlere Resistenz $\bar{x}$ in E Pc. /ml und Streuung = s. d.

Versuch	Bakteriostase	Baktericidie (48 ^h -Wert)
1. Kontrolle	0,0778 $\pm$ 0,039	0,203 $\pm$ 0,1556
2. 24 ^h -Filtrat	0,08127 $\pm$ 0,031	0,21702 $\pm$ 0,1006
3. 48 ^h -Filtrat	0,08408 $\pm$ 0,03199	0,23225 $\pm$ 0,1075
4. 24 ^h -Filtrat (autoklaviert)	0,07564 $\pm$ 0,05914	0,2329 $\pm$ 0,10324

Der statistische Vergleich der in Tab. 1 wiedergegebenen Resultate ergibt die in Tab. 2 zusammengefaßten Werte.

Tabelle 2: Statistischer Vergleich der in Tab. 1 wiedergegebenen Werte (Student's-t-Test)

Vergleich		t	P	Resultat
1 : 2	Bakteriostase	0,6711		
	Baktericidie	1,1185	$\angle 0,30$ ($> 0,20$)	
1 : 3	Bakteriostase	0,8976	-	nicht
	Baktericidie	1,4534	$\angle 0,20$ ($> 0,10$)	signifikant
1 : 4	Bakteriostase	-	-	
	Baktericidie	0,7134	-	

Dieselben Versuche sind früher unter Verwendung einer nicht verdünnten Bouillon (s. o.) durchgeführt worden, wobei eine signifikante Resistenzsteigerung beobachtet wurde. Zum Vergleich sind nachfolgend die entsprechenden Ergebnisse zusammengefaßt (Tab. 3).

Tabelle 3: Versuche zur Resistenzänderung im nährstoffreichen Medium und statistischer Vergleich mit den in Tab. 1 wiedergegebenen Werten (Student's-t-Test)

Mittlere Resistenz = $\bar{x}$ in E Pc. /ml und Streuung = s. d.

Versuch	Bakteriostase	Baktericidie (48^h -Wert)
1. Kontrolle	$0,0752 \pm 0,03406$	$0,4647 \pm 0,8985$
2. 24^h -Filtrat	$0,1485 \pm 0,08190$	$0,6319 \pm 0,2875$
Vergleich 1 : 2	t = 8,8217 P = $\angle 0,001$	t = 2,4992 P = $\angle 0,02$ ($> 0,01$)

b) Ergebnis

Aus den in Tab. 1 und Tab. 2 wiedergegebenen Resultaten ist zu entnehmen, daß bei der gewählten Versuchsanordnung (nährstoffarmes Medium) eine statistisch signifikante Veränderung der Keimresistenz gegen Pc. nicht auftritt, wenn man als Kriterium der Signifikanz eine Wahrscheinlichkeit von 1% für die Zufällbedingtheit der Differenzen annimmt.

Andererseits zeigt das Ergebnis der Tab. 3 eine deutliche Resistenzzunahme der ursprünglich sensiblen, im Filtrat einer 24^h alten Kultur resistenter Keime gewachsenen Staphylokokken.

Betrachtet man daraufhin nochmals die Ergebnisse aus Tab. 1, dann stellt man fest, daß auch hier scheinbar eine gewisse Resistenzzunahme stattgefunden hat. Die Veränderung des arithmetischen Mittels der Resistenz ist aber im Hinblick auf die bei solchen Testen sehr hohe Fehlerbreite nicht signifikant. Da bei diesen Versuchen aber ein nährstoffarmes Medium benutzt wurde, ist dieses Resultat verständlich. In Verbindung mit unverdünnter Bouillon dürfte das Resultat trotzdem als gleichartig bewertet werden. Man darf deswegen annehmen, daß man auch bei den Versuchen mit verdünnter Bouillon eine signifikante Resistenz erreichen könnte, wenn man statt der 200 Teste je Versuch ein Vielfaches davon durchführen würde.

2. Vergleichende Bestimmung der Ribonucleinsäure und der Desoxyribonucleinsäure

Nach den Arbeiten von DEMEREC, HOTCHKISS, BELJANSKI, GEORGE und PANDALAI (5, 13, 2, 10) scheint eine Beziehung zu bestehen zwischen Nucleinsäuregehalt des Mediums bzw. der Bakterien und deren Resistenz. Das beobachtete Phänomen einer Resistenzsteigerung sensibler Keime im Filtrat von resistenten Keimen könnte demnach auf die Anwesenheit von Nucleinsäuren zurückzuführen sein. Deswegen sollen entsprechende Versuche zum Nachweis der RNS und der DNS durchgeführt werden.

a) Methode

Die Nucleinsäuren wurden im Jahre 1869 von FRIEDRICH MIESCHER bei der Untersuchung von Eiterzellen entdeckt. Er nannte sie Nucleine, weil er sie aus den isolierten Kernen der Eiterzellen gewonnen hatte.

Ihren jetzigen Namen gab ihnen ALTMANN im Jahre 1889. KOSSEL entdeckte im Jahre 1891 ihre Zusammensetzung. Sie enthalten Kohlehydrat (Pentose), stickstoffreiche Substanzen (Purin- oder Pyrimidinkörper) und Phosphorsäure.

Es gibt zwei Nucleinsäuren, die sich durch ihren Pentose- und durch ihren stickstoffhaltigen Bestandteil voneinander unterscheiden. Die eine, DNS, enthält die 2-d-Desoxyribose und die andere, RNS, hat die 2-d-Ribose als Kohlehydratbestandteil. Die Nucleinsäuren sind ein wichtiger Bestandteil der tieri-

schen Zelle. Während die DNS nur auf den Zellkern beschränkt ist, befindet sich die RNS hauptsächlich im Cytoplasma und in den Mitochondrien der Zelle.

Nucleinsäurebestimmung nach SCHNEIDER (20) und BARNUM (1):

Um die Nucleinsäuren in reiner Form zu erhalten, müssen zunächst die säurelöslichen- und Lipoidphosphorbestandteile entfernt werden:

1) Entfernung der säurelöslichen Bestandteile:

500 ml Substrat (Bakterienkultur oder Bakterienfiltrat) werden mit 500 ml 10% Trichloressigsäure (TCE) gefällt und zentrifugiert. Das Überstehende wird abgegossen und das Sediment nochmals mit 2 ml 10% TCE ausgewaschen. Das Überstehende wird wieder verworfen (SCHNEIDER).

2) Entfernung des Lipoidphosphors:

Das Sediment wird mit 1 ml Aqua dest. und 4 ml 96% Alkohol versetzt und zentrifugiert. Das Überstehende gießt man ab und wäscht das Sediment nochmals mit 5 ml 96% reinem Alkohol. Das Überstehende wird wieder entfernt. Nun wird ein Gemisch von reinem 96% Alkohol und Äther im Verhältnis 3:1 hergestellt. Davon werden 5 ml dem Sediment zugesetzt. Unter ständigem Umrühren wird dieses im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach 3 Minuten gibt man nochmals 5 ml von dem Alkohol-Äther-Gemisch hinzu und nach weiteren 3 Minuten abermals die gleiche Menge. Man läßt es noch 3 Minuten kochen, kühlt dann ab und zentrifugiert. Das Überstehende wird weggegossen (SCHNEIDER).

3) Die nun in freier Form vorliegenden Nucleinsäuren werden jetzt in Ribonucleinsäure (RNS) und Desoxyribonucleinsäure (DNS) aufgeteilt.

a) Extraktion der Ribonucleinsäure:

Das Sediment wird mit 5 ml Puffer von pH 10 (zu gleichen Teilen 0,1 m Na_2CO_3 und 0,1 m NaHCO_3) versetzt, 30 Minuten im Eisschrank stehen lassen und dann zentrifugiert. Das Sediment wird dann zweimal mit je 5 ml Puffer gewaschen. Die überstehenden Flüssigkeiten werden gesammelt (= Nr. 1). Das Sediment hebt man auf. Nr. 1 wird 2mal mit je 10 ml 5% TCE zentrifugiert. Das Überstehende wird gesammelt (=Nr. 2). Das Sediment wird jetzt mit 2 ml 0,1 n-NaOH versetzt und 10 Minuten im Wasserbad bei 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen gibt man 2 ml 0,1 n-HCl und 4 ccm 5% TCE hinzu und zentrifugiert. Das Überstehende kommt zu Nr. 2. Das Sediment wird dem vorher gewonnenen Sediment zugefügt. Das gesammelte Überstehende im Reagenzglas Nr. 2 enthält die Ribonucleinsäure (BARNUM).

b) Extraktion der Desoxyribonucleinsäure:

Dem gesamten Sediment wird 1,2 ml Aqua dest. und 1,3 ml 10% TCE zugefügt und das ganze zentrifugiert. Das Überstehende kommt in das Reagenzglas Nr. 3 und das Sediment wird mit 5 ml 5% TCE versetzt und 15 Minuten im Wasserbad von 90°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird zentrifugiert und das Überstehende mit dem im Reagenzglas Nr. 3 vereint. Zum Sediment fügt man nochmals 2,5 ml 5% TCE hinzu und zentrifugiert. Das Überstehende gießt man wiederum in das Reagenzglas Nr. 3. Das Gesammelte im Reagenzglas Nr. 3 enthält die Desoxyribonucleinsäure (SCHNEIDER).

Die quantitative RNS- und DNS-Bestimmung erfolgt durch Messen ihres Phosphorgehaltes, der etwa 1/10 ihres Molekulargewichtes beträgt.

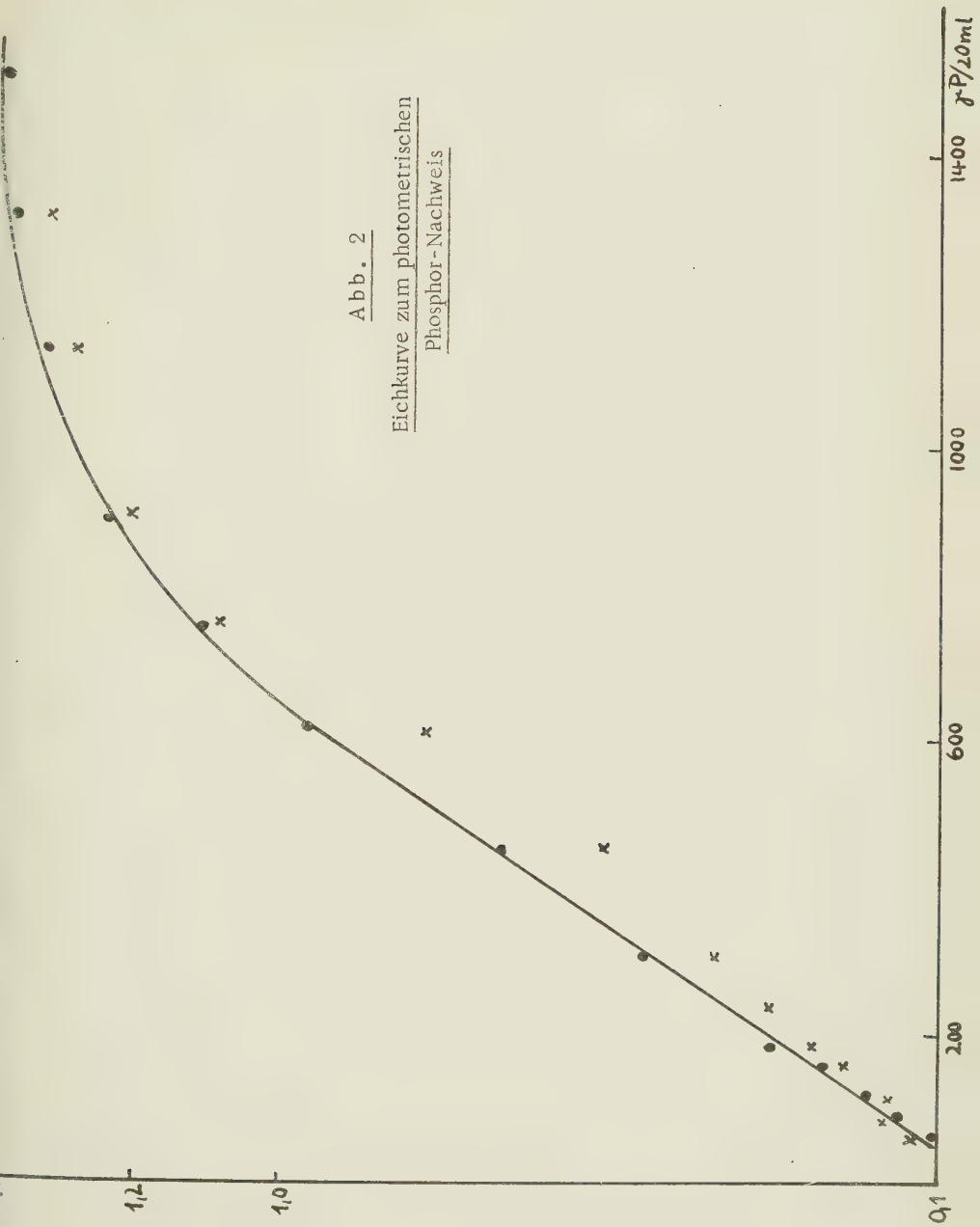
Der Phosphor wird nach der Methode von LOHMANN und JENDRASSIK (15) bestimmt.

Prinzip: Durch Reduktion mit Metol wird Phosphorammoniummolybdat in "Molybdänblau" übergeführt. Nach Zugabe von Natriumacetat wird die Reduktion abgestoppt, so daß eine Stabilisierung der entstandenen Färbung erreicht wird. Die Extinktion wird im Photometer "Eppendorf" bei 578mm und 20 mm Schichtdicke gemessen.

Ausführung:

Die Extrakte mit der DNS und RNS werden jeweils in einen Kjeldahlkolben überführt, mit Nitriersäure versetzt und verascht. Es wird etwa 10 Min. verascht, bis die im Kolben zurückbleibende Schwefelsäure wasserhell aussieht. Dann wird mit Aqua dest. abgesprüht und das Wasser auf dem Veraschungsgestell wieder eingedampft. Nun wird der Inhalt des Kjeldahlkolbens in ein 10 ml Meßkölbchen überführt und nach Hinzufügen von 2 - 3 Tropfen 0,1% Paranitrophenol als Indikator mit 45% NaOH bis zum Farbumschlag ins Gelbe neutralisiert. In diesen Ansatz pipettiert man nacheinander 2,0 ml Ammoniummolybdatlösung sowie 2,0 ml Metolreduktionslösung und mischt. Nunmehr läßt man das Meßkölbchen genau 10 Minuten stehen. Nach Beendigung der Reduktionszeit wird 4,0 ml Natriumacetatlösung hinzugegeben und mit Aqua dest. bis zur Marke 20,0 ml aufgefüllt und gemischt. Nach 5 Minuten wird die Extinktion im Stufenphotometer "Eppendorf" gegen einen O-Wert, der auf die gleiche Weise behandelt wurde und der anstelle der DNS- oder RNS-Extrakte 1,0 ml 20% TCE enthält, bei 578 nm Lichtfilter und 20 mm Schichtdicke abgelesen.

Vorher wurde eine Eichkurve aufgestellt. Die Messungen wurden einmal mit unveraschten und das andere Mal mit veraschten Substanzen durchgeführt. (Ergebnis s. Tab.4 bzw. Abb.2).



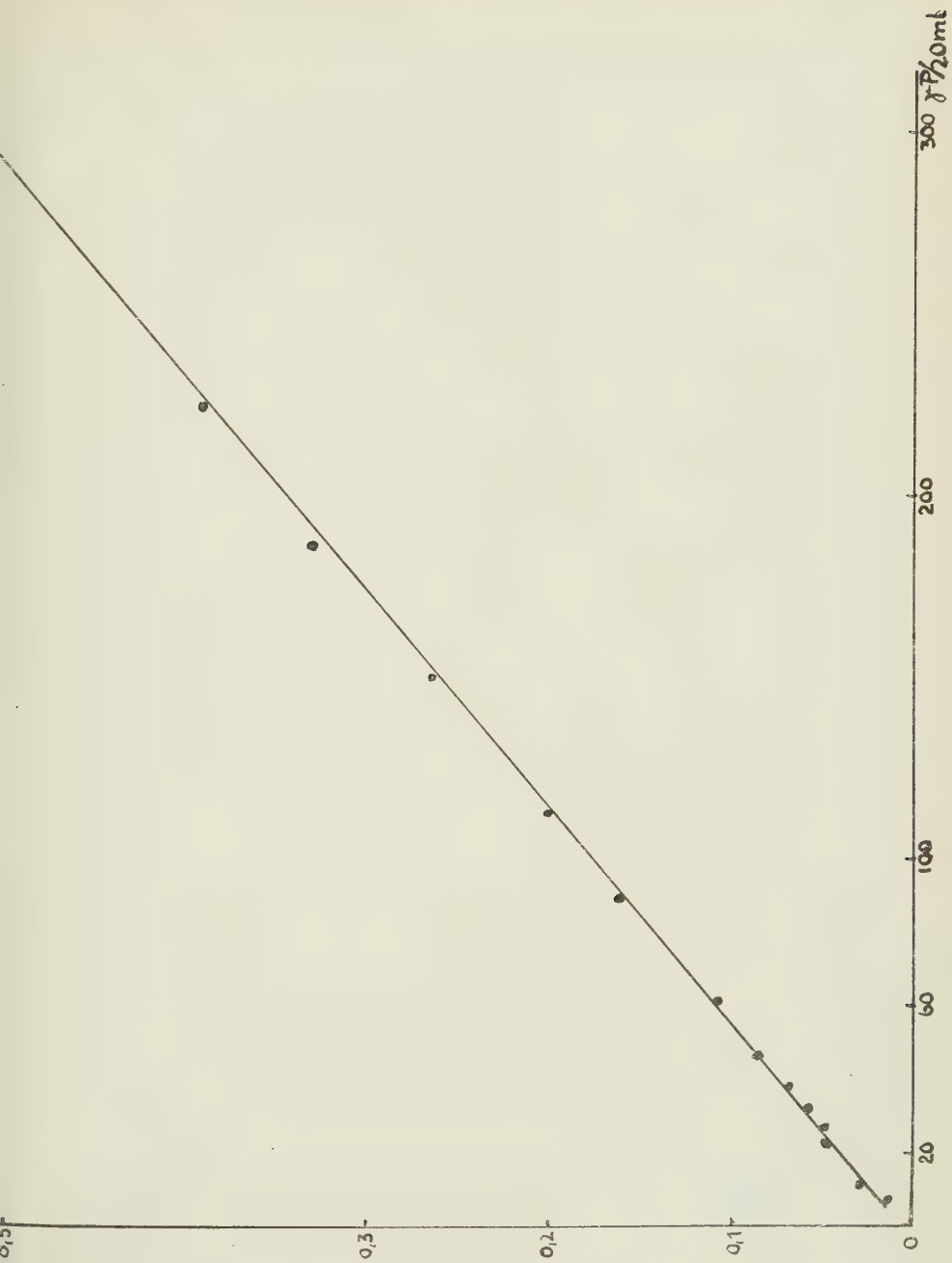


Abb. 3:

Graphische Darstellung der im Medium bzw. in Bakterien gefundenen Werte für RNS- und DNS-Phosphor

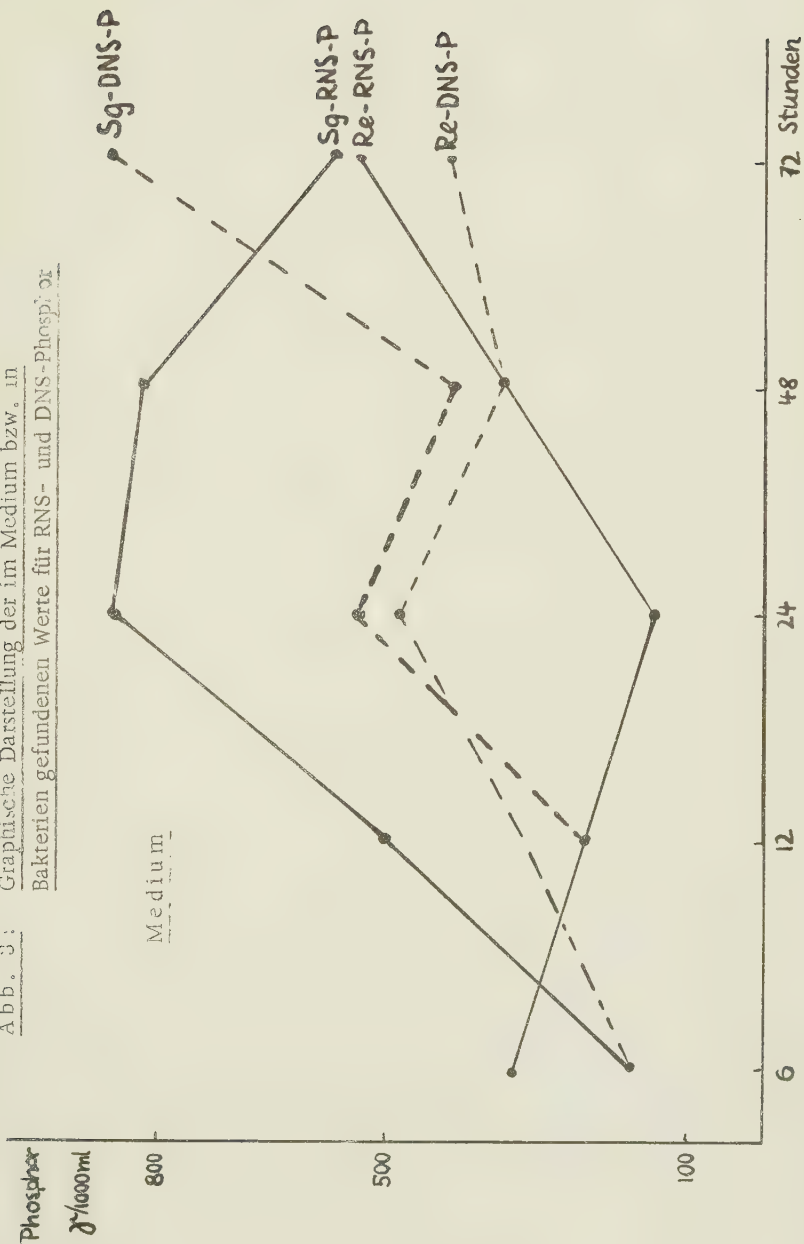


Tabelle 4: Eichwerte zum photometrischen Phosphor-Nachweis

$\gamma^P/20$ ml	Extinktion (unverascht)	Extinktion (verascht)
1851	1,40	1,4
1513	1,39	1,4
1322	1,38	1,32
1134	1,32	1,29
907,8	1,24	1,21
756,5	1,13	0,98
617,0	0,97	0,80
453,9	0,7	0,568
302,6	0,51	0,412
226,9	0,385	0,335
185,1	0,331	0,275
151,3	0,265	0,22
113,4	0,20	0,180
90,78	0,162	0,170
60,5	0,105	0,143
45,39	0,082	0,113
37,02	0,068	0,088
30,26	0,057	0,080
26,44	0,0475	0,065
22,69	0,044	0,035
11,34	0,025	0,010
5,67	0,013	X

Aus Tabelle 4 und Abb. 2 ist zu entnehmen, daß die Eichkurve bis zu einer Phosphorkonzentration von etwa 300γ je 20 ml (ohne Veraschung) eine Gerade bildet. Größere Werte liegen nicht mehr auf dieser Geraden. Deswegen werden bei den Hauptversuchen notfalls durch Verdünnung Konzentrationen hergestellt, die in diesen Bereich fallen. Die Werte der Eichkurve, die durch Veraschung gewonnen wurden, streuen verständlicherweise etwas mehr, jedoch ist die Abweichung dieser Kurve von der nichtveraschten Kurve im Konzentrationsbereich unter $300\gamma/20$ ml nicht sehr groß.

Versuchsanordnung: Die Versuche werden sowohl mit dem Pc.-sensiblen Staph. aureus Sg 511 (Sensibilität bei 0,04 E/ml) als auch mit einem Pc.-resistenten Staph. aureus-Stamm (Sensibilität 2 500 E/ml) durchgeführt.

Je 7 l Bouillon ohne Glucosezusatz werden jeweils mit soviel Keimen aus der logarithmischen Wachstumsphase beimpft, daß eine Keimkonzentration von 100 000 Keimen/ml resultiert (Endkonzentration). Die Bebrütung erfolgt bei 37 °C. Nach 6, 12, 24, 48 und 72 Stunden werden je 2 x 700 ml entnommen, eine Stunde bei 3500/min in der Kühlzentrifuge ausgeschleudert und sowohl die überstehende Flüssigkeit als auch das Bakteriensediment auf RNS- und DNS-Gehalt untersucht. Das Bakteriensediment der 2. Entnahme wird bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, um so eine Bezugsgröße für die Ausbeute an RNS und DNS zu gewinnen. (Ergebnis Tab. 5 und 6 bzw. Abb. 3 und 4).

Aus Abb. 4 ist zu entnehmen, daß der RNS-Gehalt der resistenten Keime auch zu Beginn des Kulturwachstums abnimmt im Gegensatz zum DNS-Gehalt. Bei dem sensiblen Staph. aureus Sg 511 tritt im Falle von DNS keine Abnahme ein, und im Falle von RNS sind keine wesentlichen Veränderungen zu beobachten. Vergleicht man hierzu den RNS- und DNS-Gehalt der Kulturmedien, so ist besonders auffallend, daß das Medium des resistenten Stammes durchweg einen geringeren RNS-Gehalt aufweist als das des sensiblen Stammes. Diese Differenz ist weniger ausgeprägt beim Vergleich des DNS-Gehaltes. Da der im 24- und 48-Std.-Filtrat des resistenten Keimes gezüchtete sensible Stamm eine gleichwertige Resistenzsteigerung gegen Pc. erwirbt, der RNS-Gehalt des Mediums (48 Std.-Filtrat) im letzteren Fall aber kleiner ist, kann vermutet werden, daß der RNS-Gehalt zumindest nicht der alleinige Faktor ist, der für eine Resistenzsteigerung verantwortlich ist.

Die theoretische Überlegung, daß eine Abnahme des RNS- bzw. des DNS-Gehaltes der Bakterien im Laufe der Kulturdauer mit einer Zunahme der DNS- und RNS-Konzentrationen im Medium einhergeht, scheint nur für den resistenten Stamm und RNS möglicherweise zutreffend zu sein.

Die Annahme, daß die RNS nicht der einzige Faktor für die Resistenzsteigerung ist, sollte trotz der biologischen Streuung zutreffen, da der Verlauf der entsprechenden Kurven extreme Gegensätze zeigt (s. Abb. 3).

Abb. 4: Bakterien

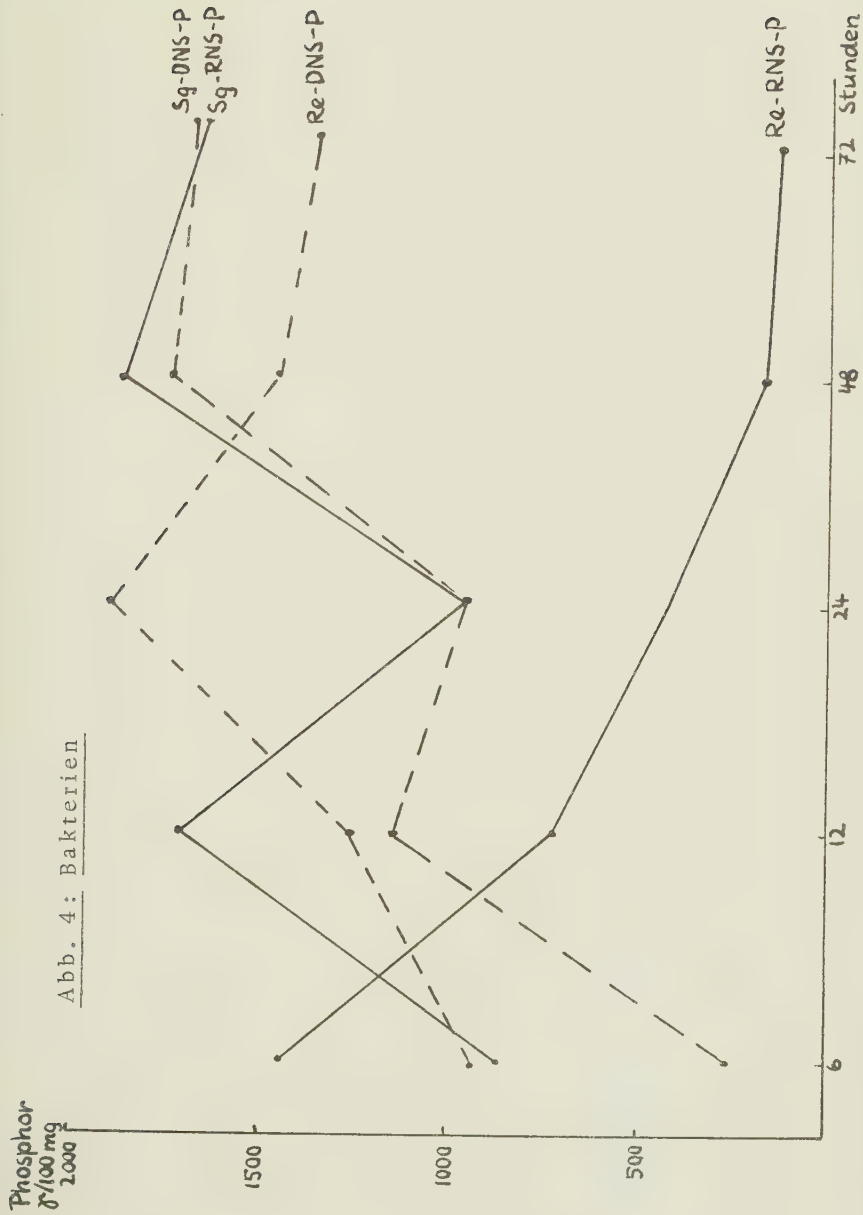


Tabelle 5: DNS- und RNS-Bestimmung in Bakterien und Medium von Staph. aureus Sg 511-Kulturen.

Sg 511		9	11	1:2 9	1:2 11	1:4 9	1:4 11	1:8 9	P _g /in 20 ml
6 Std. Bakterien	RNS	0,184							105
"	" DNS	0,052							28
"	Flüssigk. RNS	0,215							124
"	" DNS	0,0075							
12 Std. Bakterien	RNS	1,40	1,36	1,40	1,35	1,16	0,82	0,65	3360
"	" DNS	1,40	1,36	1,39	1,3	0,97	0,56	0,475	2224
"	Flüssigk. RNS	1,08	0,715	0,56	0,1				350
"	" DNS	0,287							166
24 Std. Bakterien	RNS	1,40	1,36	1,24	0,748	0,587			1480
"	" DNS	1,40	1,35	1,25	0,780	0,587			1480
"	Flüssigk. RNS	0,88	0,45						600
"	" DNS	0,645							380
48 Std. Bakterien	RNS	1,40	1,36	1,35	1,18	0,87	0,44		2400
"	" DNS	1,40	1,37	1,39	1,3	1,09	0,59	0,479	2240
"	Flüssigk. RNS	0,79	0,35						575
"	" DNS	0,491	0,028						286
72 Std. Bakterien	RNS	1,40	1,36	1,38	1,3	1,05	0,69	0,57	2880
"	" DNS	1,40	1,36	1,39	1,31	1,07	0,69	0,575	2880
"	Flüssigk. RNS	0,63	0,176						400
"	" DNS	0,99	0,59	0,51	0,052				600

Tabelle 6: RNS- und DNS-Bestimmung in Bakterien und Medium von pc. -resistenten Staph. aureus-Kulturen

res. aureus		9	11	1:2 9	1:2 11	1:4 9	1:4 11	1:8 9	1:8 11	ΣP / in 20 ml
6 Std. Bakterien	RNS	0,155								87
"	DNS	0,110								58
"	Flüssigk.	RNS 0,391								227
"	DNS	0,143								82
12 Std. Bakterien	RNS	1,40	1,35	1,18	0,85	0,66	0,205			1600
"	DNS	1,40	1,36	1,40	1,32	1,04	0,65	0,55	0,088	2720
"	Flüssigk.	RNS 0,292								170
"	DNS	0,375								218
24 Std. Bakterien	RNS	0,90	0,48							640
"	DNS	1,40	1,36	1,40	1,35	1,15	0,81	0,605	0,145	2880
"	Flüssigk.	RNS 0,184								105
"	DNS	0,59	0,125							340
48 Std. Bakterien	RNS	---								
"	DNS	1,40	1,36	1,40	1,33	1,09	0,71	0,60	0,139	3040
"	Flüssigk.	RNS ---								
"	DNS	0,43								250
72 Std. Bakterien	RNS	0,375								218
"	DNS	1,40	1,40	1,36	1,24	0,90	0,472	0,45		2112
"	Flüssigk.	RNS 0,59								370
"	DNS	0,490								300

Erklärung zu Tab. 5 und 6: Bei hohen Konzentrationen wurde die Testflüssigkeit verdünnt und die wirkliche Konzentration von RNS- bzw. DNS-Phosphor ausgehend von den gut meßbaren Werten berechnet.

Tabelle 7: RNS- und DNS-Gehalt von Bakterien und Medium auf 100 mg Trockengewicht bzw. 1000 ml bezogen

	Gewicht Keime in 700 ml	Bakterien		Flüssigkeit	
		γ -RNS-P	γ -DNS-P	γ -RNS-P	γ -DNS-P
		je 100 mg Bakt. Trockengewicht		auf 1000 ml	
Sg 6 Std.	12 mg	875	233, 33	177, 142	-
R 6 Std.	6 "	1450	966, 66	324, 28	171, 42
Sg 12 Std.	195 "	1723, 076	1140, 512	500	237, 14
R 12 Std.	215 "	744, 186	1265, 116	242, 85	311, 42
Sg 24 Std.	151 "	980, 132	980, 132	857, 14	542, 85
R 24 Std.	151, 5 "	423, 841	1900, 990	150	485, 71
Sg 48 Std.	128 "	1875	1750, 00	821, 42	408, 57
R 48 Std.	208 "	182, 692	1461, 538	-	357, 14
Sg 72 Std.	170 "	1694, 117	1694, 117	571, 42	857, 14
R 72 Std.	152 "	143, 421	1389, 473	528, 57	428, 57

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die Resistenzsteigerung von Staph. aureus Sg 511 gegen Penicillin durch Züchtung im Kulturfiltrat eines Pc. -resistenten Stammes ist nicht allein bedingt durch den Ribonucleinsäuregehalt des Filtrats.

Züchtet man den resistenten Stamm in einem nährstoffarmen Medium, dann ist das Kulturfiltrat für einen sensiblen Stamm nicht in statistisch signifikanter Weise resistenzsteigernd.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BARNUM, C. P., NASH, C. W., JENNINGS, E., NYGAARD, O.,
und VERMUND, H. : Arch. Biochem. (1950) 25/376.
2. BELJANSKI, M. : Ann. Inst. Pasteur, Comparaison de soches bac-
teriennes resistantes à des Antibiotiques avec
des soches sensibles de même Espèce. (1953),
84/402.
3. CALDWELL, P. C. und
Hinshelwood, C. : J. Chem. Soc. (1950) 3/56 zit. : Gale.
4. COOPER, P. D. : Bact. Rev. (1956). Site of action of radiopeni-
cillin. März 1/28.
5. DEMEREC, M. : Proc. nat. Acad. Sci. (1945) 31/16-24, zit. :
Cooper.

Production of staphylococcus strains resistant to
various concentrations of penicillin.
6. EAGLE, H. : J. Bact. (1954). The multiple mechanisms of
Penicillin resistance. 68/5 610.
7. EAGLE, H. : J. of Exp. Med. (1954b). The binding of Peni-
cillin in relation to its cytotoxic action. II. The
reactivity with penicillin of resistant variants of
streptococci, pneumococci and staphylococci.
8. ETTLINGER, L. : Schweiz. Med. Wschr. Wirkungsweise und Wir-
kungsmechanismus der Antibiotika. (1955)
85/12 271.
9. GALE, E. F. : Advances in Protein Chemistry. Assimilation
of Amino Acids by Gram-Positive Bacteria and
some Actions of Antibiotics Thereon. (1953)
8/285.
10. GEORGE, M. und
PANDALAI, K. M. : Indian J. Med. Res. (1948) 35/197, zit. : Gale.
11. GOOD, M. G. : Zbl. Bakter. A. physico-chemical theory of
drug-resistance. (1954) I/Orig. 161/195.

12. HOBBY, Gladys, L. MEYER,
K. und CHAFFEE, E. : Proc. Soc. exp. Biol. Med. (1942) 50/281-285.
Zit. : Gale. Observations on the mechanism
of action of penicillin.
13. HOTCHKISS, R. D. : Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative
Biology. Transfer of penicillin resistance in
pneumococci by the desoxyribonucleate derived
from resistant cultures (1951) 16/457. Zit. Gale
14. KLEIN, M. und J. Bact. The role of spontaneous variants in the
KIMMELMANN, L. J. : acquisition of streptomycin resistance by the
shigellae. (1946) 52/471-479.
15. LOHMANN und Biochem. Zsch. (1926) 178/419.
JENDRASSIK:
16. MAASS, E. A. und J. Bact. Penicillin uptake by bacterial cells.
JOHNSON, M. J. : (1949). 57/415.
17. ROWLEY, D. , MILLER, J. , Nature. Studies with radioactive penicillin.
ROWLANDS, S. und (1948). 161/109.
LESTER-SMITH, E. :
18. PASYNSKII, A. und Biohimiya. The physical chemical mechanism
KASTORSKAYA, T. : of the action of penicillin. (1947). 12/465-476.
Zit. Cooper.
19. POLLOCK, M. R. : Brit. J. exp. Path. Penicillinase adaption in
Bacillus cereus. (1950) 31/739-753. Zit.
Cooper.
20. SCHNEIDER, W. C. : J. Biol. Chem. Phosphorus compounds in animal
tissues. (1945). 161/293.
21. SMOLENS, J. und J. Bact. Studies on antibiotic resistance and
VOGT, A. B. : the nucleic acid content of bacteria. (1953)
66/2 140.

LEBENS LAUF

Am 11. August 1929 wurde ich in Wiesbaden-Biebrich geboren. Mein Vater war Gastwirt und führte mit meiner Mutter Elisabeth geb. Schmitz eine Gastwirtschaft in Wiesbaden-Biebrich. 1948 starb mein Vater.

Von 1936 an besuchte ich die Volksschule in Biebrich, trat dann in das Realgymnasium am Gutenbergplatz in Wiesbaden ein.

Während der beiden letzten Schuljahre gehörte ich dem Realgymnasium in Geisenheim an und bestand dort im März 1952 die Reifeprüfung.

Anschließend studierte ich Medizin an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und machte im Februar 1955 das Physikum.

Ich bin jetzt im 5. klinischen Fachsemester und werde im Frühjahr 1958 das Staatsexamen an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz ablegen.

